基础研究

肿瘤坏死因子-α诱导的蛋白-8样分子2促进热损伤小鼠CD4阳性T细胞凋亡

黄 鹤[1,2],田昭涛[2],姚咏明[3],黎檀实[1]
[1]解放军总医院急诊科,北京 100853;[2]济南军区总医院急诊重症中心,山东 济南 250031;[3]解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所基础部,北京 100048

摘要:目的 探讨肿瘤坏死因子-α诱导的蛋白-8样分子2(TIPE2)对重度烫伤小鼠模型脾脏$CD4^+$T淋巴细胞的凋亡的影响。**方法** 140只成年雄性BALB/C小鼠分为6组,应用小RNA干扰技术制作siTIPE2/过表达慢病毒,复制小鼠重度烫伤模型。分离BALB/c小鼠脾脏$CD4^+$T细胞,检测各组$CD4^+$T淋巴细胞凋亡, Smad2/Smad3、磷酸(P)-Smad2/P-Smad3以及B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)家族蛋白Bcl-2/Bim的表达。检测各组小鼠$CD4^+$T内线粒体膜电位改变情况及细胞色素C的变化和各组小鼠$CD4^+$T内含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase-3)、(caspase-8)、(caspase-9)的活化情况。**结果** siTIPE2-burn组$CD4^+$T淋巴细胞凋亡率为12.33%,较sham组外其余组减少,P-smad2/P-Smad3蛋白表达(灰度值)显著降低(P<0.01)。siTIPE2-burn组Bcl-2的蛋白表达较其余组升高(P<0.05),Bim的表达则降低(P<0.05)。siTIPE2-burn组线粒体膜电位细胞色素C水平均较sham组外其余组降低(P<0.05),caspase-3活性较TIPE2-burn组降低(P<0.01),caspase-8、caspase-9活性较其余组降低(P<0.05)。TIPE2-burn组凋亡率最高,TIPE2-burn组Smad2/Smad3蛋白表达较sham组明显升高(P<0.05),P-smad2/P-Smad3蛋白表达较其余组显著升高(P<0.05);$CD4^+$T内线粒体膜电位较其余组降低(P<0.01),细胞色素C水平升高,caspase-3、caspase-8、caspase-9活性较其他组均升高(P<0.05)。**结论** TIPE2作为一种重要的负向调控分子,可通过促进转化生长因子β即TGF-β/Smads信号传导通路、线粒体相关凋亡途径加速T淋巴细胞凋亡。

关键词:肿瘤坏死因子α;蛋白-8样分子2;热损伤;脓毒症;免疫;凋亡

Tumor necrosis factor-α-induced protein 8 like-2 promotes apoptosis of $CD4^+$ T lymphocytes in mice with severe burn injury

HUANG He[1,2], TIAN Zhaotao[2], YAO Yongming[3], LI Tanshi[1]
[1]Emergency Department, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; [2]Department of Critical Care Medicine, General Hospital of Jinan Command, Jinan 250031, China; [3]Trauma Research Center, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract: Objective To investigate the effect of tumor necrosis factor-α-induced protein 8 like-2 (TIPE2) on apoptosis of $CD4^+$ T lymphocytes in a murine model of severe burn injury. **Methods** A total of 140 male mice were randomly allocated into 6 groups. Small RNA interference technique was used to construct a siTIPE2-overexpressing lentivirus, and severe burn injury models were established in the mice. $CD4^+$ T cells were purified from spleen of the mice, and the expressions of TIPE2, Smad2/Smad3, P-Smad2/P-Smad3 and Bcl-2/Bimprotein in $CD4^+$ Tregs were detected. The changes in mitochondrial membrane potential and cytochrome C in $CD4^+$ T cells were detected, and the activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 were analyzed. **Results** Down-regulation of TIPE2 promoted the apoptosis of $CD4^+$ T lymphocytes in siTIPE2-burn group, in which the protein expressions of P-smad2/P-Smad3 decreased, Bcl-2 expression increased and Bim expression decreased significantly as compared with the other groups (P<0.01 or 0.05). The mitochondrial membrane potential and cytochrome C expression in $CD4^+$ T cells were down-regulated in siTIPE2-burn group (P<0.05) with a lowered caspase-3 activity compared with TIPE2-burn group (P<0.01) and decreased caspase-8 and caspase-9 compared with the other groups (P<0.05). The apoptosis rate was the highest in TIPE2-burn group, whose Smad2/Smad3 was higher than that in the sham group (P<0.05) and the expression of P-smad2/P-Smad3 significantly increased compared with the other groups (P<0.05). In TIPE2-burn group, the mitochondrial membrane potential in $CD4^+$ T cells was decreased (P<0.01), the expression of cytochrome C increased markedly (P<0.01), and the activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 were all obviously higher than those in the other groups (P<0.05). **Conclusions** As an important immunoregulatory molecule, TIPE2 can promote the apoptosis of $CD4^+$T lymphocyte in mice with sever burn injury.

Key words: tumor necrosis factor-alpha; protein 8 like-2; burn injury; sepsis; immunity; apoptosis

严重烧、创伤及外科大手术应激打击极易诱发脓毒症等感染并发症,进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),是临床烧、创伤和危重患者最主要

收稿日期:2016-05-19
基金项目:国家自然科学基金(81372054)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81372054).
作者简介:黄 鹤,主治医师,E-mail: huanghe_hh@126.com
通信作者:黎檀实,主任,E-mail: lts301@163.com

死亡原因之一。尽管临床治疗已取得显著进展,但病死率仍居高不下,成为直接影响患者预后、阻碍进一步提升危重烧伤救治成功率的突出难题,因此,提高对脓毒症的认识和防治水平无疑具有重要的理论价值及临床意[1]。

淋巴细胞凋亡在维持免疫稳态和自身免疫耐受中起着重要作用。在严重创伤打击时,无论是在中枢还是外周淋巴器官中均发现了大量淋巴细胞凋亡[2]。淋巴细胞凋亡增加可能是机体免疫抑制发生的重要机制之一[3-4]。Smad2和Smad3是转化生长因子β1 (TGFβ1)下游受体激活蛋白,活化的TGFβ1使Smad2/Smad3发生磷酸化而被激活,受到Bcl-2家族的促凋亡和抗凋亡蛋白的调节,通过细胞色素C的释放激活胱天蛋白酶(caspase-9)。最终活化的caspase-8、caspase-9都通过激活下游的caspase-3介导细胞的凋亡。Bcl-2、Bcl-xl维护线粒体的完整性从而阻碍了细胞色素C的释放;Bax、Bim等促凋亡成员则促进了这一过程的发生。

肿瘤坏死因子-α诱导蛋白-8样分子2(TIPE2)是新近发现的蛋白,在体内试验中,敲除小鼠TIPE2基因两个月后发现部分动物出现慢性疾病,表现为体重减轻、脾肿大、白细胞增加和多器官自发性炎症反应,说明TIPE2缺乏容易诱发广泛性炎症[5-6]。本课题组先前研究已证实TIPE2在烫伤小鼠T淋巴细胞存在表达,烫伤后24 h表达最高[7-8],并且发现沉默TIPE2后烫伤小鼠中IFN-γ显著升高而IL-4水平显著下降,IFN-γ/IL-4比值明显升高,说明脾脏TIPE2可能参与组织局部促炎和抗炎性细胞因子表达调节,并对局部免疫产生影响。我们假设TIPE2是介导严重烧伤后T淋巴细胞免疫功能障碍的关键调控分子,并很可能通过线粒体相关凋亡途径调节T淋巴细胞凋亡发挥作用。本研究通过研究TIPE2与$CD4^+$T细胞凋亡之间的关系,探讨其参与严重烧伤后脓毒症的调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

实验小鼠为健康清洁级BALB/C小鼠,购自中国医学科学院医学实验动物研究所,均为雄性,体质量20±2 g。140只成年雄性BALB/C小鼠分为6组:烫伤组(burn)40只,假伤组(Sham)40只,沉默TIPE2组(siTIPE2-burn)15只,沉默病毒对照组(siTIPE2-siTIPE2-negative-burn)15只,过表达TIPE2组(TIPE2-burn)15只,过表达病毒对照组(TIPE2- negative -burn)15只。

1.2 RNA干扰及过表达

TIPE2小RNA干扰慢病毒表达载体(siRNA)由上海吉凯公司合成,siRNATIPE2的DNA靶序列为5'-GAAGTGAAACTCAGGTCCG-3'[5],对照组RNA序列5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。过表达DNA靶序列上游引物为GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGGAGTCCTTCAGCTCA,下游引物为TCCTTGTAGTCCATACCGAGCTTGCCCTCGTCCAG。过表达对照组采用空载体质粒。合成DNA片段转移至pGCL-GFP构建pFIV-H1/U6-copGFP载体,转染过程严格按照说明书执行。

1.3 动物模型

小鼠适应性饲养1周,自由进食水,室温25 ℃,昼夜节律为12 h。术前禁食12 h,自由饮水。小鼠乙醚麻醉后,剃去背部鼠毛,暴露背部在99 ℃热水中烫8 s,根据公式计算小鼠体表面积,造成15%面积皮肤烫伤模型。假伤组小鼠除了浸泡温水,其他麻醉方式和喂养同烫伤组。后4组通过尾静脉分别注射携带siTIPE2/过表达或空载体对照慢过表达或空载体对照慢病毒,待2周后复制小鼠burn模型,术后予0.9%生理盐水40 mL/kg抗休克治疗,所有小鼠在烫伤24 h处死。动物实验相关方案通过动物伦理委员会批准,动物处置过程所有操作符合动物伦理学标准。

1.4 脾脏$CD4^+$T细胞分离

小鼠断颈处死后无菌条件下取脾脏,分离小鼠脾脏单个核细胞。采用MiniMACS免疫磁性分离系统,每10^8个单核细胞加入100 μL生物素-抗体"鸡尾酒",4 ℃避光预冷10 min。然后加入300 μL PBS,200 μL抗生物素磁珠4 ℃避光预冷15 min后离心洗涤。500 μL PBS重悬细胞,通过LS柱阴性分选后收集留出的细胞悬液,离心洗涤获得$CD4^+$T细胞,分离出的$CD4^+$ T用FITC标记抗CD4抗体孵育,流式细胞术鉴定正常小鼠脾脏$CD4^+$ T细胞纯度(图1)。

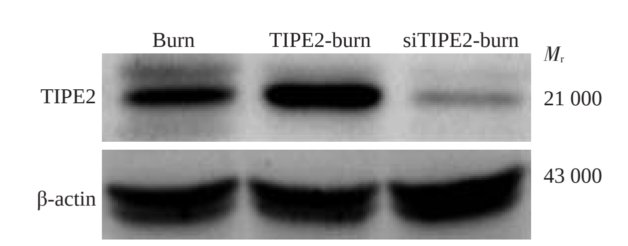


图1 Western blot检测burn组、TIPE2-burn组和siTIPE2-burn组TIPE2蛋白表达

Fig.1 Expressions of TIPE2 in burn, TIPE2-burn and siTIPE2-burn groups.

1.5 流式细胞术检测$CD4^+$T细胞凋亡

根据PE Annexin-V凋亡试剂盒,离心收集细胞(5×10^5),用预冷的PBS洗2遍(1200 r/min 离心8 min);加入100 μL的稀释液1% Binding buffer重悬细胞,分别加入5 μL Annexin V和7AAD混匀,4 ℃避光反应

20 min;加入300 μL的稀释液Binding buffer,1 h内流式细胞仪检测。

1.6 蛋白质免疫印迹试验(Western blot)检测

检测各组小鼠CD4⁺T淋巴细胞内TIPE2,Smad2/Smad3、磷酸化(P)-Smad2/P-Smad3以及Bcl-2/Bim的蛋白表达。采用BCA法对小鼠CD4⁺T细胞总蛋白进行定量分析。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中细胞蛋白上样量均为50 μg,取30 μL浓缩物上样,用100 g/L聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。第一抗体为兔抗鼠TIPE2多克隆抗体(1∶500),兔抗鼠Smad2单克隆抗体(1∶2000),兔抗鼠(P)-Smad2多克隆抗体(1∶500),兔抗鼠Smad3单克隆抗体(1∶2000),兔抗鼠(P)-Smad3单克隆抗体(1∶2000),兔抗鼠Bcl-2单克隆抗体(1∶1000),兔抗鼠Bim多克隆抗体(1∶500),第二抗体为辣根过氧化酶标记羊抗兔IgG(1∶2500),单克隆β-actin作为蛋白对照,比较烫伤组和烫伤RNAi-TIPE2组TIPE2蛋白表达情况,观察TIPE2基因沉默效果。应用ImageJ软件分析目标条带的灰度值进行蛋白定量。

1.7 流式细胞仪检测CD4⁺T线粒体膜电位变化

按JC-1试剂盒说明书配制染色工作液。将各组细胞重悬于0.5 mL细胞培养液中,并加入0.5 mL的JC-1染色工作液,颠倒数次以混匀。于细胞培养箱中37 ℃孵育20 min,600 r/min 4 ℃离心3~4 min,沉淀细胞。弃上清,用JCM染色缓冲液洗涤2次后行流式细胞仪分析。

1.8 共聚焦荧光法检测CD4⁺T细胞色素C表达

收集5×10^5各组小鼠CD4⁺T细胞,PBS润洗3次,1500 r/min离心5 min,弃上清,收集细胞。加入4%多聚甲醛溶液500 μL室温下固定30 min,PBS洗涤去上清,加入500 μL 0.2%的TritonX-100室温下穿孔20 min。PBS润洗细胞2次,1200 r/min离心5 min,弃上清。加入500 μL阻断缓冲液(1% BSA),室温下封闭30 min。按1∶400比例用1% BSA稀释细胞色素C抗体500 μL,4 ℃反应过夜。PBS洗涤1遍,1∶200比例稀二抗500 μL避光孵育1 h,PBS润洗细胞2次,弃上清。加入200 μL的DAPI染色30 min。载玻片滴20 μL样本,加1滴DAPI混匀,加盖玻片,激光扫描共聚焦显微镜观察。

1.9 化学比色法检测各组CD4⁺ T内caspase活性

取收集1×10^6各组小鼠CD4⁺T细胞,PBS洗涤2次,弃上清,加入250 μL预冷的Lysis buffer混匀,冰浴10 min将样品细胞裂解,1000 *g*离心5 min,收上清转移至EP管中。检测取96孔培养板中进行,反应体系包括:100 μg蛋白(体积50 μL)、50 μL现配的反应液、5 μL的caspase比色底物,37 ℃避光孵育2 h,Spectra MR全功能酶标仪上检测405 nm处的吸光度值。实验设调零孔组2个,一组为不加蛋白样本组,另一组为不加比色底物组,剩余体积均由稀释液补足。各实验组设2个空白孔。

1.10 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件,数据采用均数±标准差表示,组间样本比较采用方差分析,两两比较采用方差齐性检验,若方差齐性则使用LSD检验,方差不齐采用Dennett *t*检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠脾脏CD4⁺T细胞纯度

从脾脏分离CD4⁺T细胞,通过流式细胞仪检测提取的正常小鼠脾脏CD4⁺T细胞的纯度达到92.9%。胎盘蓝染色活细胞率达到98%。

2.2 CD4⁺T细胞内TIPE2蛋白表达(图2)

Western blot检测结果显示,TIPE2基因沉默使小鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞TIPE2表达下调>70%;TIPE2-burn组TIPE2蛋白表达使小鼠脾脏CD4⁺T淋巴细胞TIPE2表达上调>50%。

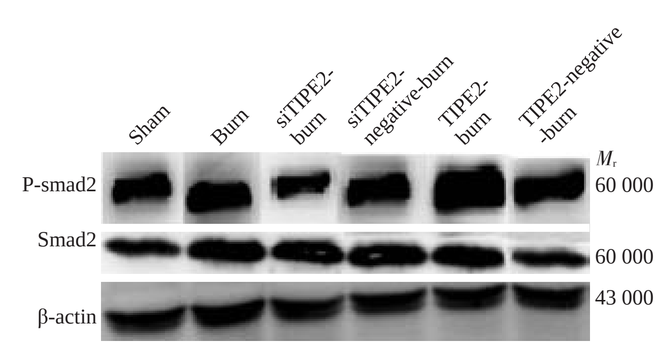


图2 CD4⁺T内Smad2和P-Smad2蛋白表达

Fig.2 Expressions of Smad2/P-smad2 in CD4⁺T cells.

2.3 各组CD4⁺T细胞凋亡率比较

CD4⁺T凋亡率TIPE2-burn组凋亡率最高(69.8%),而siTIPE2-burn组CD4⁺T凋亡率为12.33%,与Sham组(10.82%)无统计学差异,但显著低于其余5组($P<0.01$)。

2.4 CD4⁺T内Smad2/Smad3、P-Smad2/P-Smad3和Bcl-2/Bim蛋白表达

从图2、3表1、2可以看出,burn组Smad2/Smad3和P-smad2/P-Smad3较sham组和siTIPE2-burn组升高;siTIPE2-burn组Smad2/Smad3无明显降低,P-smad2/P-Smad3表达较其余组显著降低($P<0.05$)。TIPE2-burn组Smad2/Smad3较sham组明显升高($P<0.05$),较其余组无统计学意义,P-smad2/P-Smad3表达较其余组显著升高($P<0.05$)。再结合图4、表3可见,siTIPE2-burn组Bcl-2的表达升高($P<0.05$),Bim的表达则降低($P<0.05$)。TIPE2-burn组反之。

2.5 CD4⁺T线粒体膜电位变化

siTIPE2-burn组线粒体膜电位为(97.50±2.40)%,

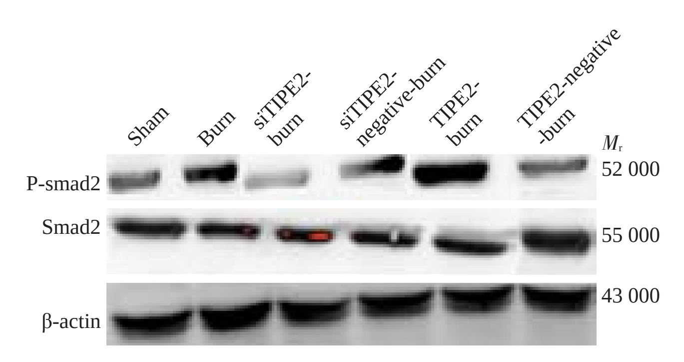


图3 Western blot检测CD4+T内Smad3和P-Smad3蛋白表达
Fig.3 Expressions of Smad3/P-Smad3 in CD4+T cells.

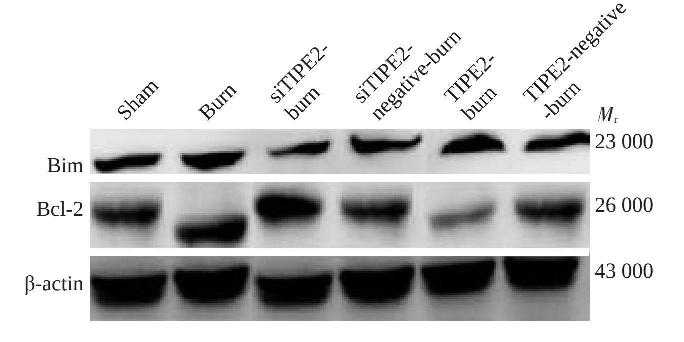


图4 各组小鼠脾脏CD4+T内Bcl-2/Bim蛋白表达
Fig.4 Expressions of Bcl-2/Bim in CD4+T cells.

表1 各组小鼠脾脏CD4+T内Smad2/P-Smad2蛋白表达比较
Tab.1 Expressions of Smad2/P-Smad2 in CD4+ T lymphocytes (*Mean*±*SD*)

Group	Smad2	P-smad2
Sham	1.05±0.20	1.95±0.30
Burn	1.52±0.38*	2.13±0.12*
siTIPE2-burn	1.48±0.40	1.77±0.25#
siTIPE2-negative-burn	1.53±0.26	2.15±0.46
TIPE2-burn	1.60±0.15#	2.98±0.52△
TIPE2-negative-burn	1.55±0.51	2.16±0.42

Smad2: **P*<0.05 burn group *vs* sham and siTIPE2-burn groups. #*P*<0.05, TIPE2-burn group *vs* sham group. P-smad2: **P*<0.05 burn group *vs* sham and siTIPE2-burn groups; #*P*<0.05, siTIPE2-burn group *vs* burn and TIPE2-burn groups; △*P*<0.05, TIPE2-burn *vs* other groups.

表2 各组小鼠脾脏CD4+T内Smad3/P-Smad3蛋白表达比较
Tab.2 Expressions of Smad3/P-Smad3 in CD4+ T lymphocytes (*Mean*±*SD*)

Group	Smad3	P-smad3
Sham	0.85±0.34	0.95±0.10
Burn	0.92±0.33*	1.10±0.05*
siTIPE2-burn	0.78±0.42	0.76±0.15#
siTIPE2-negative-burn	0.93±0.56	1.08±0.16
TIPE2-burn	0.98±0.05a	1.48±0.08△
TIPE2-negative-burn	0.97±0.41	1.09±0.11

Smad3: **P*<0.05 burn *vs* siTIPE2-burn group; #*P*<0.05, TIPE2-burn *vs* sham group. P-smad3: **P*<0.05 burn *vs* sham and siTIPE2-burn groups; #*P*<0.05 siTIPE2-burn *vs* burn and TIPE2-burn groups; △*P*<0.05, TIPE2-burn *vs* other groups.

较sham组(98.20±1.20)%外其余组比较升高(*P*<0.05)。TIPE2-burn组CD4+T内线粒体膜电位为(70.90±1.4)5%,较其余组降低(*P*<0.01)。

2.6 CD4+T细胞色素C表达(图5)

siTIPE2-burn组细胞色素C水平为33.50±3.40%,较除sham组(23.20±3.40)%外降低,(*P*<0.05);TIPE2-

表3 各组小鼠脾脏CD4+T内Bcl-2/Bim蛋白表达比较
Tab.3 Expressions of Bcl-2/Bim in CD4+ T lymphocytes (*Mean*±*SD*)

Group	Bcl-2	Bim
Sham	1.15±0.20	1.06±0.30
Burn	1.22±0.38	1.11±0.12
siTIPE2-burn	1.58±0.40*	0.87±0.25*
siTIPE2-negative-burn	1.23±0.26	1.15±0.46
TIPE2-burn	0.90±0.15#	1.48±0.52#
TIPE2-negative-burn	1.25±0.51	1.16±0.42

**P*<0.05 siTIPE2-burn *vs* other groups; #*P*<0.05, TIPE2-burn *vs* other groups.

burn组细胞色素C水平为(51.90±3.41)%,较其余组有所升高(*P*<0.05)。

2.7 化学比色法检测各组CD4+T内caspase活性

siTIPE2-burn组CD4+T内caspase-3较sham组,burn组,siTIPE2-negative-burn组和TIPE2-negative-burn略降低,但无统计学意义;较TIPE2-burn组降低(*P*<0.01),caspase-8、caspase-9活性较其余组降低(*P*<0.05)。TIPE2-burn组caspase-3、caspase-8、caspase-9活性较其他组均升高(*P*<0.05,表4)。

3 讨论

细胞免疫的状态被认为与脓毒血症的发生和发展密切相关。免疫细胞的凋亡是脓毒症介导免疫抑制的主要原因。动物研究证实脓毒症可以导致严重免疫细胞凋亡。大量动物和人研究证实在脓毒血症外周和脾脏淋巴细胞减少,凋亡是淋巴细胞减少的主要的机制。防止T淋巴细胞凋亡可以增强宿主抵抗脓毒血症的能力。有研究发现抗凋亡免疫治疗可以改善其生存率。因此,T淋巴细胞凋亡机制和凋亡预防是脓毒症新的研究及治疗靶点[9-12]。降低脓毒症死亡率需要从预防免疫T细胞减少,加速其功能恢复,阻断免疫抑制通路的研究着手[13-14]。业已明确,脓毒症时调节T细胞通过膜结

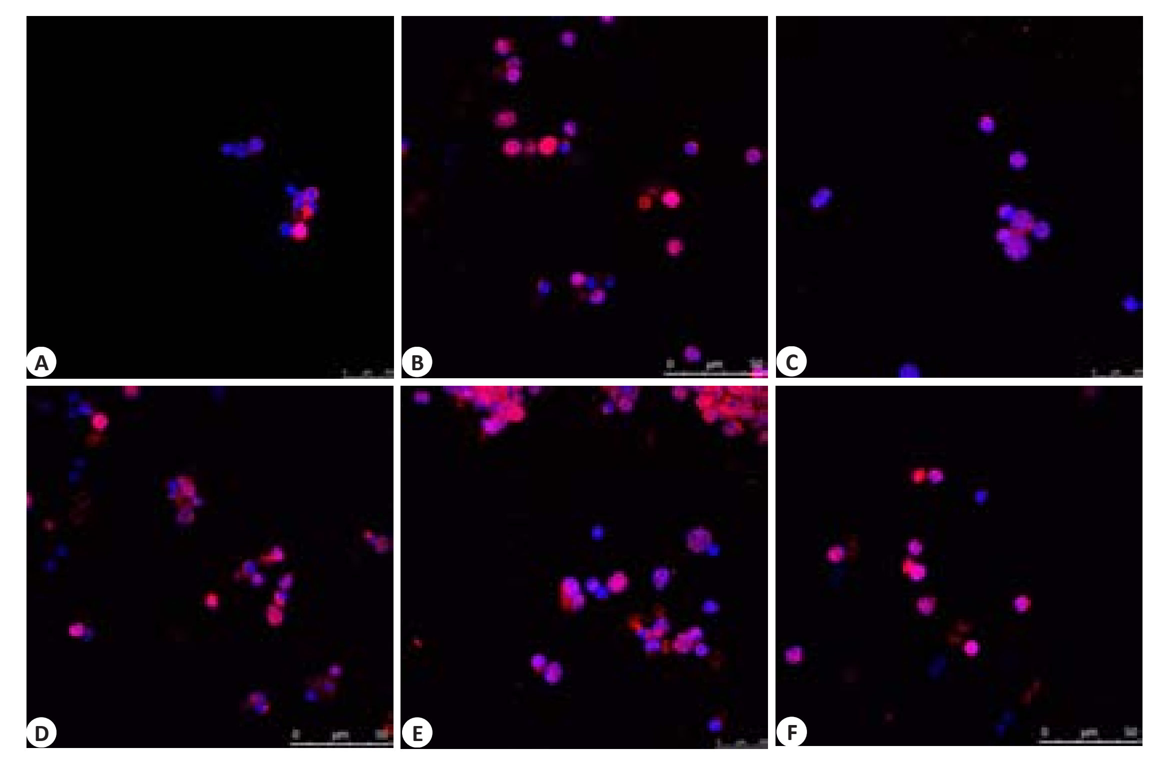


图5 各组CD4+ T细胞色素C表达

Fig.5 Changes in cytochrome C in CD4+T cells. The cytochrome C protein was directly labeled as red by the red pigment, and the DAPI was stained with blue. *A*: Sham; *B*: Burn; *C*: siTIPE2-burn; *D*: siTIPE2-negative-burn; *E*: TIPE2-burn; *F*: TIPE2-negative -burn.

表4 CD4+ T内caspase的活性变化比较

Tab.4 Caspase activity of T CD4+ cells in each group (*Mean*±*SD*)

Group	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
Sham	0.112±0.015	0.009±0.004	0.080±0.008
Burn	0.325±0.007	0.305±0.006	0.405±0.010
siTIPE2-burn	0.272±0.010*	0.122±0.005*	0.122±0.005*
siTIPE2-negative-burn	0.347±0.009	0.310±0.008	0.412±0.013
TIPE2-burn	0.560±0.012##	0.485±0.014#	0.604±0.016#
TIPE2-negative-burn	0.330±0.009	0.309±0.010	0.410±0.020

Caspase3: *P<0.05 siTIPE2-burn *vs* TIPE2-burn group; Caspase8, Caspase9: *P<0.05 siTIPE2-burn *vs* other groups; #P<0.05, TIPE2-burn *vs* other groups.

合TGFβ1通路,参与了效应T细胞的凋亡[15-16, 18]。其中线粒体通过释放凋亡基因在凋亡中起着关键性作用[17, 19]。

2008年Sun等[5]发现TIPE2以来,越来越多的证据证实TIPE2在维持免疫稳态中起着重要作用。主要通过Toll样受体信号通路和T细胞受体进行调节,另据报道小剂量内毒素攻击小鼠模型,与正常野生型组相比,TIPE2基因敲除组出现明显休克反应[5]。研究说明TIPE2在急、慢性炎症病理过程中具有潜在调节效应[5-6, 20]。有趣的是TIPE2在炎症组织中高表达,在正常组织少量表达或无表达[21-22]。因此推测TIPE2是防止机体过度免疫反应和维持免疫稳态的重要调节器。TIPE2与TNFAIP8家族其它成员有基因同源性,其被认为有调节凋亡的功能[23-25]。有资料证实,内毒素刺激巨噬细胞TIPE2可下调多条炎症相关信号转导通路,减弱转录因子激活蛋白-1的活性。并且TIPE2基因缺陷细胞呈现对TLR和T细胞受体信号活化的高反应性[5, 20, 26]。TIPE2参与机体免疫动态平衡调控过程的分子机制可能与其结合caspase-8有关。先前研究证实TIPE2蛋白存在于CD4+T细胞的胞浆中,沉默TIPE2基因表达后,小鼠脾T淋巴细胞增殖反应明显增强,凋亡减少,提示TIPE2的表达可促进T淋巴细胞的凋亡[7-8],我们推测TIPE2参与了TGF-β1信号通路介导CD4+T细胞凋亡过

程。本研究旨在探讨通过体内实验siRNA沉默TIPE2表达下调对急性损伤后CD4⁺T细胞介导的凋亡的影响。

本研究发现，burn组Smad2/Smad3磷酸化明显增强，TIPE2基因沉默能够抑制Smad2/Smad3的活化。结果提示沉默TIPE2基因表达后，降低了小鼠脾T淋巴细胞TGFβ1下游信号分子Smad2/Smad3活化，从而降低CD4⁺T内促调亡蛋白Bim表达，促进抗调亡蛋白Bcl-2表达，从而降低了小鼠脾T淋巴细胞的凋亡。反推TIPE2可以减少脓毒症Bcl-2蛋白表达，增加Bim蛋白表达，提示TIPE2作为一种重要的负向调控分子，具有促进正常及烧伤后脓毒症小鼠脾CD4⁺T淋巴细胞凋亡的作用，机制可能通过活化的TGFβ1使Smad2/Smad3发生磷酸化而被激活，受到Bcl-2家族的促凋亡和抗凋亡蛋白的调节，通过细胞色素C的释放caspase-9。最终活化的caspase-8、caspase-9都通过激活下游的caspase-3介导T细胞的凋亡。

总之，TIPE2作为一种重要的负向调控分子与机体细胞免疫功能异常密切相关，很可能是体内关键的细胞免疫调节因子之一，其确切作用及关键环节值得深入探讨。本研究证实TIPE2促进严重烧伤后脾脏T淋巴细胞的凋亡，这对于从新的角度深入认识TIPE2在烧伤脓毒症发病中的地位具有重要理论意义和临床价值，并通过小RNA干扰技术可对TIPE2表达进行干预，为脓毒症免疫机制和诊治研究提供新方向。今后仍需进一步扩大样本量，对其结论进行充分验证 。

参考文献：

[1] Kumar G, Kumar N, Taneja A, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007) [J]. Chest, 2011, 140(5): 1223-31.

[2] Zhang QH, Chen Q, Kang JR, et al. Treatment with gelsolin reduces brain inflammation and apoptotic signaling in mice following thermal injury[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8(1): 118.

[3] Russell JA. Management of sepsis [J]. Engl J Med, 2006, 355: 1699-713.

[4] Jiang LN, Yao YM, Sheng ZY. The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication[J]. J Interferon Cytokine Res, 2012, 32(8): 341-9.

[5] Sun HH, Gong SY, Carmody RJ, et al. TIPE2, a negative regulator of innate and adaptive immunity that maintains immune homeostasis[J]. Cell, 2008, 133(3): 415-26.

[6] Li D, Song L, Fan Y, et al. Down-regulation of TIPE2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Immunol, 2009, 133(3): 422-7.

[7] Luan YY, Yao YM, Zhang L, et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha induced protein 8 like-2 contributes to the immunosuppressive property of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice[J]. Mol Immunol, 2011, 49(1/2): 219-26.

[8] Jiang LN, Yao YM, Zhu XM, et al. The effect of tumor necrosis factor-α-induced protein 8 like-2 on immune response of CD4⁺ T lymphocytes in mice after thermal injury[J]. Eur Inflamm, 2013, 11 (1): 83-98.

[9] Wesche D, Lomas-Neira J, Perl M, et al. Ayala A: leukocyteapoptosis and its significance in sepsis and shock[J]. Leukoc Biol, 2005, 78 (2): 325-37.

[10] Bandyopadhyay G, De A, LaudanskiK, et al. Negative signaling contributes to T-cell anergy in traumapatients[J]. Crit Care Med Crit Care Med, 2007, 35(3): 794-801.

[11] Chang K, Unsinger J, Davis C, et al. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor andmitochondrial-mediated apoptosis[J]. FASEB, 2007, 21(3): 708-19.

[12] Kasten K, Tschöp J, Adediran S, et al. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis[J]. Shock, 2010, 34(4): 327-36.

[13]Cabrera-Perez J, Condotta S, Badovinac V, et al. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity[J]. Leukoc Biol, 2014, 96(5): 767-77.

[14] Kim JS, Kim SJ, Lee SM. Genipin attenuates sepsis-induced immunosuppression through inhibition of T lymphocyte apoptosis [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 27(1): 15-23.

[15] 尹承芬, 秦庆华, 董 宁, 等. 调节性T细胞通过膜结合转化生长因子β1影响效应性T细胞凋亡[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2013, 8 (3): 215-9.

[16] Luan YY, Yin CF, Qin QH, et al. Effect of regulatory T cells on promoting apoptosisof T lymphocyte and its regulatory mechanism in sepsis[J]. J Interferon Cytokine Res, 2015, 35(12): 969-80.

[17] Ten Dijke P, Hill C. New insights into TGF-beta-Smadsignaling[J]. Trends Biochem, 2004, 29(5): 265-73.

[18] 秦庆华. 调节性T细胞促进效应T细胞凋亡在脓毒症免疫抑制中的作用及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学. 2013: 1-3.

[19] Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(4): 632-40.

[20] Freundt EC, Bidere N, Lenardo MJ. A different TIPE of immune homeostasis[J]. Cell, 2008, 133(3): 401-2.

[21] Zhang GZ, Hao CY, Lou YW, et al. Tissue-specific expression of TIPE2 provides insights into its function[J]. Mol Immunol, 2010, 47 (15): 2435-42.

[22] Kumar D, GokhaleP, BroustasC, et al. Expression of SCC-S2,an antiapoptoticmolecule,correlates with enhanced proliferation and tumorigenicity of MDA-MB 435 cells[J]. Oncogene, 2004, 23(2): 612-6.

[23] Zhang CB, Chakravarty D, Sakabe I, et al. Role of SCC-S2 in experimental metastasis and modulation of VEGFR-2, MMP-1, and MMP-9 expression[J]. Mol Ther, 2006, 13(5): 947-55.

[24]Woodward MJ, De Boer J, Heidorn S, et al. Tnfaip8 is an essential gene for the regulation of glucocorticoid-mediated apoptosis of thymocytes[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 316-23.

[25] Zhang X, Wang JW, Fan C, et al. Crystal structure of TIPE2 provides insights into immune homeostasis[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(1): 89-90.

（编辑：吴锦雅）